

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

16. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   4 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 1 1 4 5 0 3  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 1 1 4 5 0 3 ]

出   願   人      積 水 化 学 工 業 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):

REC'D 08 JUL 2004

WIPO

PCT

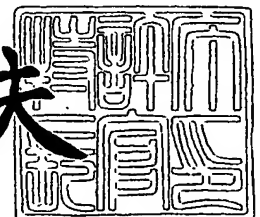
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   6 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 03P00710

【提出日】 平成15年 4月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
    内

    【氏名】 伊豆本 義隆

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
    内

    【氏名】 秦 純一

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
    内

    【氏名】 井手野 晃

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
    内

    【氏名】 古谷 昌弘

【特許出願人】

    【識別番号】 000002174

    【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

    【代表者】 大久保 尚武

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005083

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫原及び抗体の作成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シャペロニンと抗原蛋白とがペプチド結合を介して連結された融合蛋白質からなる免疫原であって、  
前記抗原蛋白は、シャペロニンリングの内部に収納されている  
ことを特徴とする免疫原。

【請求項 2】 抗原蛋白は、シャペロニンサブユニットの N 末端、C 末端及びシャペロニンサブユニット同士の連結部からなる群より選ばれる少なくとも一カ所にペプチド結合を介して連結されていることを特徴とする請求項 1 記載の免疫原。

【請求項 3】 シャペロニンサブユニットと抗原蛋白との間に蛋白質分解酵素の切断アミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の免疫原。

【請求項 4】 シャペロニンサブユニット同士の連結部に蛋白質分解酵素の切断アミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の免疫原。

【請求項 5】 シャペロニンリングは、5～10 個のシャペロニンサブユニットから構成されることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 記載の免疫原。

【請求項 6】 シャペロニンは、シャペロニンリングがリング面又は側面を介して非共有結合的に会合し、繊維状構造を形成していることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 記載の免疫原。

【請求項 7】 シャペロニンは、バクテリア、古細菌又は真核生物に由来することを特徴とする請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載の免疫原。

【請求項 8】 抗原蛋白は、セロトニンレセプター 5-HT<sub>1a</sub>R 又はこの 6 残基以上の部分蛋白質であることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載の免疫原。

【請求項 9】 抗原蛋白をコードする遺伝子とシャペロニンサブユニットをコードする遺伝子とを含有する遺伝子を転写・翻訳してなることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5、6、7 又は 8 記載の免疫原。

【請求項 10】 抗原蛋白をコードする遺伝子は、その全アミノ酸配列に対する

cDNA又は6残基以上のアミノ酸配列をコードする部分遺伝子であることを特徴とする請求項9記載の免疫原。

【請求項11】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10記載の免疫原をヒトを除く動物に免疫することを特徴とする抗体の作成方法。

【請求項12】 抗原蛋白は、セロトニンレセプター5-HT<sub>1a</sub>Rであることを特徴とする請求項11記載の抗体の作成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ほとんど全ての抗原蛋白について簡便に作製することができ、その抗原性を安定的に効率よく発現させることができる免疫原及びその免疫原を用いた抗体の作成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

抗体はエンザイムイムノアッセイやラジオイムノアッセイ法等の特異的な抗原抗体反応を利用した検出手段、アフィニティークロマトグラフィー等の物質の精製手段等において、いまや欠くことのできないものとなっている。抗体は、その抗原決定基を有する免疫原を用いて動物を免疫し、それら動物の免疫反応を利用することにより作成されている。

【0003】

近年は、生体由来の抗原蛋白を精製することなく、未知の又は既知の遺伝子をクローニングし、この遺伝子に由来する組み換え抗原蛋白を免疫原とする抗体作成が盛んに行われている。しかしこのような方法を用いても目的とする抗体が得られない場合がある。たとえば、①抗原蛋白が宿主細胞にとって有毒な蛋白であるためにその抗原蛋白を産生すべき組み換え宿主細胞が死滅し、免疫原として十分な蛋白量を確保することが非常に困難な場合、②抗原蛋白の構造が、組み換え技術による製造過程における変性等により、生体由来のものと異なる場合、③抗原蛋白が、構成アミノ酸に疎水性アミノ酸を多く含むために不溶性となり、免疫原として十分な免疫応答を引き起こせない場合、更に④免疫原として使用した抗原

蛋白が接種動物の血中で速やかに分解されてしまうため十分な免疫応答を引き起こせない場合等が考えられる。

#### 【0004】

このような問題を解決する方法として、抗原決定基と考えられる部位を人工的に合成した、いわゆるペプチド抗原の利用や、蛋白質に脂質を付加修飾することにより免疫原性を高め十分な免疫応答を引き起こす試み等がなされているが、上記全ての問題を同時に解決する方法は開発されていない（特許文献1参照）。とりわけ免疫原として使用した抗原蛋白が接種動物の血中で速やかに分解されてしまう場合を解決する試みはなされていないのが現状である。

#### 【0005】

##### 【特許文献1】

国際公開第02/052029号パンフレット

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、ほとんど全ての抗原蛋白について簡便に作製することができ、その抗原性を安定的に効率よく発現させることができる免疫原及びその免疫原を用いた抗体の作成方法を提供することを目的とする。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、シャペロニンと抗原蛋白とがペプチド結合を介して連結された融合蛋白質からなる免疫原であって、上記抗原蛋白は、シャペロニンリングの内部に収納されている免疫原である。

#### 【0008】

本発明者らは、鋭意検討の結果、抗原蛋白とシャペロニンとの融合蛋白質を免疫原として使用すると、①たとえその抗原蛋白が宿主細胞にとって有毒な蛋白質であっても所望する抗原蛋白を産生すべき組み換え宿主細胞が死滅することを防ぐことができ、②組み換え技術による製造過程における変性等でその抗原蛋白の構造が本来の抗原の構造と異なってしまうことを防ぐことができ、③たとえ構成アミノ酸に疎水性アミノ酸が多く含まれていてもその抗原蛋白が不溶性になること

を防ぐことができ、更に④その抗原蛋白が接種動物の血中で速やかに分解されてしまうことをも防ぐことができ、シャペロニンを用いない抗原蛋白に較べて、動物において一層高い免疫応答が引き起こされることを見出し本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳述する。

#### 【0009】

本発明の免疫原は、シャペロニンと抗原蛋白とがペプチド結合を介して連結された融合蛋白質からなるものである。

上記シャペロニンとは分子シャペロンの一種である。細胞に熱ショック等のストレスを与えると、一般的に分子シャペロンと呼ばれる蛋白質群の発現が誘導される。分子シャペロンは、エネルギー物質であるATPの存在下又は非存在下で蛋白質の折り畳みを支援したり、構造安定化に貢献したりする。これらの分子シャペロンの中でも、その分子量が約60kDaのものはシャペロニンといわれ、バクテリア、古細菌及び真核生物の全ての生物に存在し、蛋白質の折り畳み支援や変性防御の機能を有している。

#### 【0010】

シャペロニンはグループ1型とグループ2型とに大別される。バクテリアや真核生物のオルガネラに存在するシャペロニンはグループ1型に分類され、コシャペロニンと称される分子量約10kDaの蛋白質の環状複合体を補因子とする。一方、グループ2型シャペロニンは、真核生物の細胞質や古細菌に見られ、それらの構造や機能に関しては不明な点が多く残されており、グループ1型のコシャペロニンに相当する蛋白質も現在のところ見つかっていない。

#### 【0011】

シャペロニンは、シャペロニンサブユニットからなるシャペロニンリングがリング面を介して非共有結合的に会合した2層のリング構造体を形成する。大腸菌シャペロニン（GroEL）の場合、図1に示すように、シャペロニンは内径4.5nm、高さ14.5nmの空洞（キャビティ）を有する。1層のシャペロニンリングのキャビティは60kDaの球状蛋白質1つが十分に納まる空間を有する。シャペロニンはこのキャビティ内部に、ポリペプチドや変性蛋白質を一時的に

収納し、その折り畳み構造形成を助け、構造を安定化させる機能をもつ。

#### 【0012】

種々の細胞由来のシャペロニンの立体構造が近年、X線結晶構造解析によって詳細に明らかにされつつある。隣接するサブユニット間及びリング間の相互作用により形成されるシャペロニンの構造は、具体的には、アミノ酸間の疎水的相互作用及び静電相互作用によっている。また、シャペロニンサブユニットのN末端及びC末端はともにキャビティ側に位置し、フレキシビリティの高い構造となっており、特に大腸菌由来シャペロニンGroELは、C末端の少なくとも23アミノ酸がフレキシビリティの高い構造を示すことがわかっている。

#### 【0013】

また、Mg-ATPの存在化では、シャペロニンは高濃度（1mg/mL以上）に存在する場合、リング面又は側面を介して非共有結合的に会合し、繊維状構造を形成する場合がある（Trent, J. D., et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 5383-5388; Furutani, M. et al., 1998, J. Biol. Chem. 273, 28399-28407）。

#### 【0014】

本発明の免疫原において、シャペロニンは、シャペロニンサブユニットからなるシャペロニンリングがリング面を介して非共有結合的に会合した2層リング構造を形成しているか、又は、シャペロニンリングがリング面又は側面を介して非共有結合的に会合し、繊維状構造を形成していることが好ましい。

#### 【0015】

バクテリア、古細菌由来のシャペロニンは、遺伝子組換え手法により大腸菌細胞質可溶性画分に容易に大量生産させることが可能である。更に、大腸菌細胞質可溶性画分で発現したシャペロニンの精製品を電子顕微鏡観察することによって、様々の生物由来のシャペロニンが大腸菌でも自己集合し、2層リング構造のシャペロニンを形成することが確認されている。

#### 【0016】

本発明で用いられるシャペロニンとしては特に限定されず、バクテリア、古細菌



及び真核生物のいずれの由来のものであってもよい。また、シャペロニンのリング構造への自己集合能が維持されていれば、野生型のみならずアミノ酸変異体を使用することも可能である。例えば、シャペロニンリングの内部に収納された抗原蛋白を早く放出したい場合には、シャペロニンの各サブユニットの会合力が弱められた変異体を使用することもできる。

#### 【0017】

本発明で用いられる抗原蛋白としては特に限定されず、所望する抗原蛋白を広く選択することができる。例えば、生産させると組み換え発現宿主に有毒な抗原蛋白、精製方法が確立されていない抗原蛋白、非常に変性しやすい抗原蛋白、組み換え体を作成することが困難な抗原蛋白、組み換え体が本来の抗原蛋白と異なる構造を採ってしまう抗原蛋白等が挙げられる。

#### 【0018】

本発明の免疫原では、抗原蛋白はシャペロニンリングの内部に収納されている。これにより、①たとえその抗原蛋白が宿主細胞にとって有毒な蛋白質であっても所望する抗原蛋白を産生すべき組み換え宿主細胞が死滅することを防ぐことができ、②組み換え技術による製造過程における変性等でその抗原蛋白の構造が本来の抗原の構造と異なってしまうことを防ぐことができ、更に③たとえ構成アミノ酸に疎水性アミノ酸が多く含まれていてもその抗原蛋白が不溶性になることを防ぐことができる。本発明の免疫原を動物に接種すると、生体中の蛋白質分解酵素は、まずシャペロニンを攻撃してその立体構造を徐々に破壊し、その結果、包埋されている抗原蛋白は徐々に放出されることになる。ゆえに、④その抗原蛋白が接種動物の血中で速やかに分解されてしまうことを防ぐこともできる。

#### 【0019】

本発明の免疫原において、シャペロニンと抗原蛋白とはペプチド結合を介して連結されている。本発明の免疫原におけるシャペロニンと抗原蛋白との連結パターンとしては、抗原蛋白がシャペロニンリングのキャビティ内に確実に納まるように、シャペロニンサブユニットのN末端、C末端又はシャペロニンサブユニット同士の連結部にペプチド結合を介して連結されることが好ましい。

#### 【0020】

本発明の免疫原において、シャペロニンと抗原蛋白との連結箇所は一カ所であってもよく、二カ所以上であってもよい。例えば、上記抗原蛋白が、ホモ又はヘテロの形態で2量体又はそれ以上の四次構造を形成するものである場合には、抗原蛋白を構成する1種又は2種のサブユニットが、互いに連結したシャペロニンサブユニットのN末端及びC末端にペプチド結合を介して連結されることが好ましい。例えば、シャペロニンサブユニット8個でシャペロニンリングを構成する古細菌由来シャペロニンの場合、シャペロニンサブユニットを8個連結した8量体シャペロニンのN末端及びC末端に、2量体を形成することにより抗原性を発現する抗原蛋白を構成するそれぞれのサブユニットをペプチド結合を介して連結すれば、シャペロニンリング内の極めて近接した領域にそれぞれのサブユニットが存在するため、2量体からなる四次構造を形成しやすく、安定した抗原性の発現が可能となる。

#### 【0021】

本発明の免疫原は、シャペロニンサブユニットと抗原蛋白との間に蛋白質分解酵素の切断アミノ酸配列を有することが好ましく、また、シャペロニンサブユニット同士の連結部に蛋白質分解酵素の切断アミノ酸配列を有することが好ましい。これにより、本発明の免疫原を動物に接種した場合、生体内の蛋白質分解酵素は、まず、シャペロニンサブユニット同士を結合する部位を攻撃してそのリング構造を徐々に破壊し、更に、抗原蛋白とシャペロニンサブユニットの結合部位を攻撃して抗原蛋白を放出させる。このため、抗原蛋白への攻撃は最後となるため、該抗原蛋白の免疫原性の発揮を延長させ得ることができる。

#### 【0022】

上記蛋白質分解酵素の切断アミノ酸配列としては特に限定されず、例えば、PreScissionプロテアーゼ、トロンビン、Factor Xa、プラスミン、キモトリプシン等の蛋白質分解酵素の認識部位が挙げられる。

#### 【0023】

本発明の免疫原を作製する方法としては特に限定されないが、抗原蛋白をコードする遺伝子とシャペロニンサブユニットをコードする遺伝子とを含有する遺伝子を転写・翻訳して融合蛋白質を作製する方法が好適である。例えば、抗原蛋白を

コードする遺伝子とシャペロニンサブユニットをコードする遺伝子とを含有する遺伝子を、同一のプラスミド上でポリシストロニックに連結するか、又は、同一の宿主内で共存・複製することが可能な2種の異なるプラスミドのそれぞれに導入し同一の宿主内で共発現させる方法；抗原蛋白をコードする遺伝子とシャペロニンサブユニットをコードする遺伝子とを含有する遺伝子とシャペロニン又はシャペロニン連結体のみをコードする遺伝子とを、同一のプラスミド上にポリシストロニックに連結するか、又は、同一の宿主内で共存・複製することが可能な2種の異なるプラスミドのそれぞれに導入して、同一の宿主内で共発現させる方法等が挙げられる。このような方法によれば、どのような抗原蛋白又は補足因子でもシャペロニンと融合した蛋白質として画一的な条件での生産及び精製が可能である。

この際、抗原蛋白をコードする遺伝子は、その全アミノ酸配列に対する cDNA 又は6残基以上のアミノ酸配列をコードする部分遺伝子である。

#### 【0024】

上記宿主としては特に限定されず、バクテリア、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体、植物固体又は昆虫個体のいずれであってもよく、また、無細胞翻訳系であってもよい。

#### 【0025】

本発明の免疫原としての融合蛋白質を精製する方法は特に限定されず、従来公知の方法を用いることができ、例えば、以下の方法等が挙げられる。即ち、宿主内で融合蛋白質を発現させた後、細胞を回収して破碎し、上清を回収する。融合蛋白質を硫酸塩析で回収したのち、適当な緩衝液に溶解し、疎水性クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーによって該融合蛋白質を回収する。これを限外濾過によって濃縮したのち、濃縮液を5-50 mM程度の塩化マグネシウムと50-300 mM程度の塩化ナトリウム又は塩化カリウムが含有された緩衝液を展開液としてゲル濾過をおこない、排出限界値直後のフラクションを回収することにより該融合蛋白質を精製することができる。融合蛋白質のN末端又はC末端に6-10個のヒスチジン（「ヒスチジンタグ」と呼ばれる）を連結させた場合には、ニッケル等の金属キレートカラムを用いれば、融合蛋白質の精製はより

簡便で効率的となる。また用いるシャペロニンに対する抗体を用いて、免疫沈降又はアフィニティークロマトグラフィーによっても迅速・簡便に精製することができる。ただし、リング構造を形成した融合蛋白質のみを回収するには、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を組み合わせることが好ましい。シャペロニンが耐熱性のものである場合には、宿主からの抽出液を 60-80℃で加熱処理することによって大部分の宿主由来蛋白質を沈殿させることができ、融合蛋白質の精製をより簡略化することができる。このとき、抗原蛋白自身が耐熱性を有していなくても、シャペロニンの内部に保持されているので変性することはない。

#### 【0026】

上記のいずれの方法によっても、得られた融合蛋白質の形態は透過型電子顕微鏡によって観察することができる。所望の抗原蛋白がシャペロニンリングの内部に収納されていると、外径約 14-16 nm 程度のシャペロニン特有のリング構造が観察される。融合蛋白質のリング構造が不安定な場合は、精製の過程でマグネシウム及び ATP を存在させておくことで、リング構造をもつ融合蛋白質を効率的に回収できる。

#### 【0027】

目的とする抗原蛋白が膜結合性蛋白質又は膜貫通性蛋白質である場合には、融合蛋白質を精製した後、疎水性アルキル基がオクチル (C8) からドデシル (C12) である非イオン性界面活性剤を作用させると、ミセルの直径がほぼ生体膜に相当し、シャペロニン内部で正しい構造を形成しやすい。上記非イオン性界面活性剤としては、例えば、 $\beta$ -オクチルグルコシド、Triton X100、Nonidet P-400、Tween 20 等が挙げられる。

#### 【0028】

本発明は更に、本発明の免疫原をヒトを除く動物に免疫することによる抗体の作成方法をも提供する。本発明の免疫原を動物に免疫する方法としては、通常公知の免疫法を用いることができ、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の動物に、本発明の免疫原を静脈内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内に注射等の手段で投与することで、動物を目的の抗原蛋白で免疫しうる。

## 【0029】

ポリクローナル抗体を作成する場合には上記手段で本発明の免疫原を投与して免疫した動物から血液を採取し血清を得ることができ、この血清より、例えば、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー等の通常公知の方法により、抗体を調製できる。

## 【0030】

モノクローナル抗体を作成する場合は、抗体産生細胞（脾臓細胞）と骨髄腫細胞とを融合させて得たハイブリドーマの中から目的の抗原蛋白と結合する抗体を分泌するハイブリドーマをスクリーニングし、最終的には目的とする抗体を産生する単クローンを分離する、いわゆる細胞融合法が広く知られ、日常的にこの方法によりモノクローナル抗体の製造が行われている（富山朔二、安東民衛編「単クローン抗体実験マニュアル」、講談社発行、1987）。

## 【0031】

すなわち上記融合蛋白質を上記手段で免疫の対象となる動物に投与して免疫することにより、モノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば、免疫後の脾臓細胞を得ることができる。更にこの免疫細胞と動物の骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作成し、所望する抗原決定基を認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより目的とする抗体を製造することができる。この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髄腫細胞としては、既に公知のものを適宜選択して用いることができ、例えば、SP2/0-Ag14、P3-NS1-1-Ag4-1、MPC11-45、6、TG1.7（以上、マウス由来）；210.RCY.Ag1.2.3（ラット由来）；SKO-007、GM15006TG-A12（以上、ヒト由来）等が挙げられる。

## 【0032】

上記の免疫細胞とこれらの骨髄腫細胞との細胞融合は、例えば、ケーラーとミルシュタインの方法（Kohler、G. and Milstein、C.、Nature、256、495（1975））等の通常公知の方法に準じて行うことができる。

より具体的には、この細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）

、センダイウイルス（H V J）等の通常公知の融合促進剤の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

#### 【0033】

所望のハイブリドーマの分離は、例えば、H A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン）培地等の通常の選別用培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行う。このようにして得られたハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単一クローン化に供することができる。

#### 【0034】

得られたハイブリドーマのなかから目的とするモノクローナル抗体産生株を検索するには、例えば、E L I S A 法、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法、R I A 法等の一般的な検索法を用いることができる。

#### 【0035】

ハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、更に液体窒素中で長時間保存することもできる。ハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を採取するには、ハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清から得る方法や、このハイブリドーマに適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水から得る方法等を用いることができる。このようにして得られたモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。このようにして得られたモノクローナル抗体は、免疫した融合蛋白質が有する抗原決定基を特異的に認識するモノクローナル抗体である。

#### 【0036】

一方近年は、抗体産生細胞（脾臓細胞）から抗体遺伝子をクローニングすることによりモノクローナル抗体を生産する技術が開発されている。すなわち、遺伝子組換え技術により、抗体産生細胞から抗体をコードする遺伝子でファージを形質転換し、ファージ表面に目的の抗体を発現させて所望の抗体の遺伝子を簡便にス

クリーニングする方法であり、ファージディスプレイ法と呼ばれている。

#### 【0037】

ファージディスプレイ法で目的とするモノクローナル抗体を作成する場合には、特開平 7-502167 号公報に開示されている方法を用いることができる。すなわち上記の融合蛋白質で免疫した動物の抗体産生細胞から mRNA を分離し、抗体の相補性決定領域 (CDR) をはさむ部分に特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法で Fab に相当する部分を増幅し、ファージミッドベクターに組み込んで多様性を高度に保持した抗体ライブラリーを作成することができる。ヘルパーファージの存在下に Fab を発現させ、免疫抗原を用いて特異 Fab 産生クローンを濃縮及び選別し、目的 Fab を大腸菌で大量に発現させる。免疫学的活性を十分に検索した後、Fc 部分を含んだ発現ベクターに組み込み、培養細胞に完全型 IgG を発現させることができる。

#### 【0038】

本発明を、抗原蛋白としてセロトニンレセプターを用いた場合を例に挙げて以下に説明する。しかしながら、本発明は、この特定の抗原蛋白に限られるものではない。当業者であればセロトニンレセプターを他の所望の抗原蛋白と置き換えることにより不必要な実験を行うことなく本発明の利点を得ることは容易である。

#### 【0039】

5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT、又は、セロトニンとも称される) は、セロトニン作動性神経細胞にて見られる細胞表面レセプターを介してその効果を発揮する、有効な天然に存在する神経伝達物質である。セロトニンは中枢神経系 (CNS) 及び末梢系の両方で哺乳動物の体の機能に重要な役割を演じていることが明らかにされてきている。CNS では脳幹を起点とするセロトニン作動性ニューロンが脳及び脊髄の殆どの領域に広がる非常に広汎性の系を形成することが解明されている。このような広汎性の系であることから、セロトニンが、生理学的応答、及び CNS から生ずる疾病の発現、すなわち、睡眠、食餌、痛みの知覚、体温調節、血圧の調節、抑鬱、分裂病等の幾つかの行動に関与していると考えられている。

#### 【0040】

セロトニンは末梢系においても同様に重要な役割を演じている。例えば、多くのセロトニンが胃腸系に見いだされ、セロトニンはこの系において種々の収縮、分泌、及び電気生理作用を仲介する。セロトニンに対して極めて感受性の強いもう一つの例として心血管系が挙げられる。

#### 【0041】

セロトニンは、細胞表面のレセプターに結合することにより、細胞生理学上の作用を引き起こす。現在、多数のタイプのセロトニンレセプターが存在することが確認されている。セロトニンレセプターとしては、少なくとも4種の主要ファミリー（5-HT<sub>1R</sub>-4R）が知られており、各ファミリーは薬理的及び／又は構造的な相違に基づいて分類された8ないし10のレセプターを含んでいる。各ファミリーは、例えば、5-HT<sub>1aR</sub>、5-HT<sub>1bR</sub>、5-HT<sub>1cR</sub>、5-HT<sub>1dR</sub>又は5-HT<sub>1eR</sub>と称される1又はそれ以上のタイプからなる。更には、あるタイプのセロトニンレセプターには、5-HT<sub>1d $\alpha$ R</sub>又は5-HT<sub>1d $\beta$ R</sub>のような種々のサブタイプが知られている。

#### 【0042】

多数の構造的に分化したセロトニンレセプターの存在は、サブタイプ選択性の薬理的物質が生成され得る可能性を提供している。個々のレセプターのサブタイプは中枢末梢セロトニン作動性系の異なった部分に特異的な作用を及ぼすよう機能し得ることから、サブタイプ選択性の薬理的物質を開発することにより、副作用のより少ない、選択性を増した新しい治療物質が得られる。一例として或る血管系において、内皮細胞上の5-HT<sub>1</sub>レセプターの刺激は血管拡張を引き起こし、一方平滑筋細胞上の5-HT<sub>2</sub>レセプターの刺激は血管収縮を引き起こす。いろいろな型のセロトニンレセプターの薬理作用及び臨床的知見は、例えば、グレンノン（Glennon R.A.）等、ニューロサイエンス・アンド・ビヘイビラル・レビューズ（Neuroscience and Behavioral Reviews）14（1）巻：35ページ（1990）に詳述されている。

#### 【0043】

セロトニンは広い体内分布を示すことから、セロトニン作動性系に影響を及ぼす薬物の開発に大きな関心が持たれている。とりわけ、レセプター特異性アゴニス



ト及びアンタゴニストは、不安、鬱、高血圧、偏頭痛、強迫性疾患、及び、癌の化学療法の誘発する嘔吐を含む広範囲の疾病の治療薬としての関心がもたれている。セロトニンレセプターに対する抗体は研究上有用であるのみならず、治療薬としてのレセプター特異性アゴニスト及びアンタゴニストのひとつの候補となるものである。

#### 【0044】

このようなセロトニンレセプターのひとつである 5-HT<sub>1a</sub>R は 7 回膜貫通性の膜蛋白質であり、現在のところ組み換え蛋白質を入手することが難しく、また良い抗体を得がたい抗原蛋白として知られている。本発明を適用して、5-HT<sub>1a</sub>R とシャペロニンとの融合蛋白質を作成し免疫原として用いれば、免疫動物において高い免疫反応が引き起こされる。この場合、抗原蛋白としては、セロトニンレセプター 5-HT<sub>1a</sub>R 又はこの 6 残基以上の部分蛋白質が用いられる。更に、5-HT<sub>1a</sub>R がシャペロニンに融合している場合にのみ特異的な免疫応答が見られることから、本発明により作成された免疫原が免疫応答の強化に有効であることは明らかである。

#### 【0045】

本発明はいかなる抗原蛋白であっても、シャペロニンとの融合蛋白質を利用することによって該抗原蛋白をシャペロニンリングの内部に収納することにより、シャペロニンを用いない対応抗原蛋白に較べて一層高い免疫応答を引き起こすことができる。

#### 【0046】

##### 【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0047】

以下の実施例は、ヒト由来のセロトニンレセプター 5-HT<sub>1a</sub>R とシャペロニンとの融合蛋白質の製造及び抗体作成におけるその使用に関する。

以下の実験においては、分子生物学、蛋白質化学及び免疫学の分野における当業者によく知られ利用可能な多くの技術を用いているが、そのような方法は、必ず

しも詳細には記載していない。酵素は市販のものを入手し、供給者のプロトコルに従って使用した。細菌培地及び細菌のクローニング技術は、サンプブック (Sambrook) らによって記載されている方法を使用した ((モレキュラー・クローニング: ア ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、CSHプレス1989))。

#### 【0048】

(実施例1) 大腸菌シャペロニン GroEL 7回連結体とセロトニンレセプター 5-HT1aRの融合蛋白質の発現  
大腸菌シャペロニン GroELの遺伝子の塩基配列は既知でありその配列を配列1に示した。この配列を持つ遺伝子をもとに、GroELの7回連結体発現ベクター pTrc (GroEL) 7を作製した。pTrc (GroEL) 7においてはGroEL遺伝子が直列に並んでおり所望の抗原蛋白の遺伝子を導入すれば、7個のGroELと所望の抗原蛋白とが融合した融合蛋白質を発現できる。このプラスミドは7個連結したシャペロニンサブユニットにPreScissionプロテアーゼ切断配列を介して所望の抗原蛋白がつながった融合蛋白質を発現するベクターである。

#### 【0049】

所望の抗原蛋白としてヒト由来のセロトニンレセプター 5-HT1aRを選択した。その遺伝子配列は既知であり配列2に示した。この5-HT1aR遺伝子を、PCRによって5'末端にBglIIサイトを3'末端にXhoIサイトを設けた後、BglII及びXhoI処理が施された発現ベクター pTrc (GroEL) 7に組み込み、GroEL 7回連結体と5-HT1aRとの融合蛋白質を合成する発現ベクター pTrc (GroEL) 7・5HT1ARを構築した。

#### 【0050】

発現ベクター pTrc (GroEL) 7・5HT1ARにより大腸菌BL21 (DE3) 株を形質転換した後、GroEL 7回連結体と5-HT1aRとの融合蛋白質の発現を行った。なお、発現実験のコントロールとして5-HT1aR遺伝子のみを単独で組み込んだ発現ベクター pTH1ARを作成し、これにより

大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した後、抗原蛋白の発現を行った。

#### 【0051】

発現実験をおこなった大腸菌抽出液の上清と沈澱画分とを SDS-PAGE によって分析したところ、発現ベクター pTrc (GroEL) 7・5HT1AR を保持する大腸菌の抽出液サンプルのみにおいて、可溶性画分に融合蛋白質の分子量に相当する位置 (約 470 kDa) にバンドが検出された。一方、発現ベクター pTH1AR を保持する大腸菌の抽出液サンプルでは可溶性画分に抗原蛋白は検出されなかった。ただし、pTH1AR を保持する大腸菌の抽出液サンプルでは不溶性画分に弱い強度のバンドが検出された。以上のことから、5-HT1aR 遺伝子は単独では大腸菌可溶性画分で発現することはできないが、GroEL 7 回連結体との融合蛋白質として発現させることで、可溶性蛋白質として発現することがわかった。

#### 【0052】

次に、発現ベクター pTrc (GroEL) 7・5HT1AR を保持する大腸菌の抽出液を塩析し、塩析により沈澱した融合蛋白質を回収した後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に溶解し、5 mM MgCl<sub>2</sub>/50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に透析した。透析後、透析内液を DEAE-セファロース及び TSK gel Super Q-5PW カラムによるアニオン交換クロマトグラフィー及び Superose 6 (アマシャムファルマシアバイオテック社製) によるゲルろ過によって、融合蛋白質を精製した。これにより 7 個の GroEL とセロトニンレセプター 5-HT1aR とが融合した融合蛋白質を得ることができた。

#### 【0053】

融合蛋白質の精製標品を透過型電子顕微鏡によって観察したところ、シャペロニン特有のリング構造が観察された。以上のことから、5-HT1aR は GroEL リングのキャビティ内部に 1 分子ごとに格納されることによって可溶性画分に発現したと考えられる。

#### 【0054】

得られた融合蛋白質を PreScission プロテアーゼで切断することによ

り5-HT1aRを取り出した。まず、得られた融合蛋白質を2.5M尿素の存在下でインキュベートした後、50mM K-リン酸緩衝液(pH7.0)に対して透析を行った。透析後の溶液にPreScissionプロテアーゼを作用させ、15℃で一昼夜インキュベーションした。その後、その反応液をTSK gel Super Q-5PWカラム(トソー社製)によるイオン交換クロマトグラフィーにかけることにより、5-HT1aRを回収した。

#### 【0055】

(実施例2) 大腸菌シャペロニンと5-HT1aRとの融合蛋白の免疫原としての能力の評価

大腸菌シャペロニンと融合した5-HT1aRが免疫応答を誘発する能力を評価するために、不完全フロイントアジュバントを混合した大腸菌シャペロニンと5-HT1aRとの融合蛋白質をウサギの皮下に注射した。通常、抗体価は感作後7-10日に上昇すると考えられており、免疫応答の強さを評価するために、免疫後3, 5, 7, 10日目に血清を回収しELISA法により分析した。ELISAでは、96穴プレートに5-HT1aR溶液(Euroscreen S.A.社)を添加し、30℃にて3時間インキュベーションすることにより、5-HT1aRをプレート上に固定化した。リン酸緩衝液(PBS)で洗浄した後、PBS中の1%BSAでブロックした。採取した血清抗体を0.05%トゥイーン20を含有する1%BSA/PBS中で系列希釈した。希釈した血清を5-HT1aRでコーティングしたウエルに加え、室温にて1時間インキュベートした。プレートを0.05%トゥイーン20を含有するPBSで洗浄した後、ペルオキシダーゼをコンジュゲートした種特異的抗IgGの適当な希釈液を加え、室温にて1時間インキュベートした。各ウエルに100 $\mu$ lのペルオキシダーゼ基質溶液を加え、A410を測定した。血清のELISA力価の終点は、対照ウサギの平均に比べて吸光度の値が2SD大きい血清希釈となるように設計した。対照実験として、5-HT1aRをウサギに注射し同様の実験を行った。その結果、5-HT1aRとシャペロニンとの融合蛋白を免疫原として用いた場合、5-HT1aRのみを用いた場合に較べて、ウサギにおいて高い免疫反応が引き起こされることが明らかになった(表1)。よって本発明により作成される免疫原

が免疫応答の強化に有効であることが明らかとされた。

【0056】

【表1】

大腸菌シャペロニンと融合した5-HT1aR又は5-HT1aRで免疫したウサギの血清の ELISA

採血日	融合蛋白質 ELISA 力価 <sup>(b)</sup>	5-HT1aR ELISA 力価	対照 <sup>(a)</sup> ELISA 力価
3日後	1/10	<1/10	<1/10
5日後	1/500	<1/10	<1/10
7日後	1/2000	1/10	<1/10
10日後	1/4000	1/10	<1/10

(a) 対照では不完全フロイントアジュバントのみをウサギに注射した。

(b) 力価は血清の希釈倍率で著されている。

【0057】

(実施例3) 古細菌シャペロニンTCP8回連結体とセロトニンレセプター5-HT1aRの融合蛋白質の発現

古細菌シャペロニンTCP遺伝子は既知でありその塩基配列を配列3に示した。この配列を持つ遺伝子をもとに、TCPの8回連結体発現ベクターpTCP8を作製した。pTCP8においてはTCP遺伝子が直列に並び、所望の抗原蛋白の遺伝子を導入すれば、8個のTCPと所望の抗原蛋白とが融合した融合蛋白質を発現できる。このプラスミドは8個連結したシャペロニンにトロンビン切断配列を介して所望の抗原蛋白がつながった融合蛋白質を発現させるベクターである。

【0058】

所望の抗原蛋白として、配列2に示されたヒトセロトニンレセプター5-HT1aR遺伝子を、PCRによって5'末端にNheIサイトを3'末端にXhoIサイトを設けた後、NheI及びXhoI処理が施されたpTCP8に導入し、TCP8回連結体と5-HT1aRとの融合蛋白質を合成する発現ベクターpTCP8・5HT1ARを構築した。このプラスミドは8個連結したシャペロニンにトロンビン切断配列を介して5-HT1aRがつながった融合蛋白質を発現するベクターである。

## 【0059】

本発現ベクター pTCP8・5HT1ARにより大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した後、融合蛋白質の発現を行った。なお、発現実験のコントロールとして 5-HT1aR 遺伝子のみを単独で組み込んだ発現ベクター pTHT1AR を作成し、これにより大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した後、抗原蛋白質の発現を行った。

## 【0060】

実施例 1 と同様に各大腸菌抽出液の上清と沈澱画分を SDS-PAGE によって分析したところ、5-HT1aR は単独では大腸菌可溶性画分で発現することはできないが、TCP8 回連結体との融合蛋白質として発現させることで、可溶性蛋白質として発現することがわかった。

## 【0061】

更に実施例 1 と同様に、発現ベクター pTCP8・5HT1AR を保持する大腸菌の抽出液から融合蛋白質を精製した。またその融合蛋白質をトロンビンで切り出すことにより、5-HT1aR を回収した。

## 【0062】

精製標品を透過型電子顕微鏡によって観察したところ、シャペロニン特有のリング構造が観察された。以上のことから、5-HT1aR は TCP のキャビティ内部に 1 分子ごとに収納されることによって可溶性画分に発現したと考えられる。

## 【0063】

(実施例 4) 古細菌シャペロニンと 5-HT1aR との融合蛋白質の免疫原としての能力の評価

古細菌シャペロニンと融合した 5-HT1aR が免疫応答を誘発する能力を、実施例 2 と同様の方法で評価した。その結果、5-HT1aR と古細菌シャペロニンとの融合蛋白質を免疫原として用いた場合、5-HT1aR のみを免疫原とした場合に較べて、ウサギにおいてより高い免疫反応が引き起こされることが明らかになった (表 2)。よって本発明により作成される免疫原が免疫応答の強化に有効であることが明らかにされた。

## 【0064】

【表 2】

古細菌シャペロニンと融合した 5-HT<sub>1a</sub>R 又は 5-HT<sub>1a</sub>R で免疫したウサギの血清の ELISA

採血日	融合蛋白質 ELISA 力価 <sup>(b)</sup>	5-HT <sub>1a</sub> R ELISA 力価	対照 <sup>(a)</sup> ELISA 力価
3 日後	1/10	<1/10	<1/10
5 日後	1/500	<1/10	<1/10
7 日後	1/2000	1/10	<1/10
10 日後	1/4000	1/10	<1/10

(a) 対照では不完全フロイントアジュバントのみをウサギに注射した。

(b) 力価は血清の希釈倍率で著されている。

## 【0065】

## 【発明の効果】

本発明によれば、これまでその抗体を取得することが困難であつたいかなる抗原蛋白であっても、シャペロニンとの融合蛋白質とすることによって該抗原蛋白をシャペロニンリングの内部に収納することにより、シャペロニンを用いない場合に較べて一層高い確率で抗体を取得できる。

## 【0066】

## 【配列表】

<110> 積水化学工業株式会社 SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.

<120> 免疫原及び抗体の作成方法

<130> 03P00710

<160> 3

<210> 1

<211> 1647

<212> DNA

## &lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 1

atggcagcta aagacgtaaa attcggtaac gacgctcgtg tgaaaatgct gcgcggcgta 60  
aacgtactgg cagatgcagt gaaagttacc ctcgggtccaa aaggccgtaa cgtagttctg 120  
gataaatctt tcggtgcacc gaccatcacc aaagatgggtg tttccgttgc tcgtgaaatc 180  
gaactggaag acaagttcga aaatatgggt gcgcagatgg tgaaagaagt tgcctctaaa 240  
gcaaacgacg ctgcaggcga cggtagcacc actgcaaccg tactgggtca ggctatcatc 300  
actgaaggtc tgaaagctgt tgctgcgggc atgaaccgga tggacctgaa acgtggatc 360  
gacaaagcgg ttaccgctgc agttgaagaa ctgaaagcgc tgtccgtacc atgctctgac 420  
tctaaagcga ttgctcaggt tggtagcatc tccgctaact ccgacgaaac cgtaggtaaa 480  
ctgatcgtg aagcgatgga caaagtcggt aaagaaggcg ttatcacctg tgaagacggt 540  
accggtctgc aggacgaact ggacgtgggt gaaggtagtc agttcgaccg tggctacctg 600  
tctccttact tcatcaacaa gccggaaact ggcgtagtag aactggaaag cccgttcac 660  
ctgctggctg acaagaaaat ctccaacatc cgcgaaatgc tgccggttct ggaagctgtt 720  
gccaaagcag gcaaaccgct gctgatcatc gctgaagatg tagaaggcga agcgtggca 780  
actgctgttg ttaacacatc tcgtggcatc gtgaaagtcg ctgcggttaa agcaccgggc 840  
ttcggcgatc gtcgtaaagc tatgctgcag gatatcgcaa ccctgactgg cggtagcgtg 900  
atctctgaag agatcggtat ggagctggaa aaagcaacc tggagacct gggtcaggct 960  
aaacgtgttg tgatcaacaa agacaccacc actatcatcg atggcgtggg tgaagaagct 1020  
gcaatccagg gccgtgttgc tcagatccgt cagcagattg aagaagcaac ttctgactac 1080  
gaccgtgaaa aactgcagga acgcgtagcg aaactggcag gcggcggttc agttatcaaa 1140  
gtgggtgctg ctaccgaagt tgaaatgaaa gagaaaaaag cacgcgttga agatgccctg 1200  
cacgcgaccc gtgctgcggt agaagaaggc gtggttgctg gtggtgggtg tgcgctgac 1260  
cgcgtagcgt ctaaactggc tgacctgcgt ggtcagaacg aagaccagaa cgtgggtatc 1320  
aaagttgcac tgcgtgcaat ggaagctccg ctgcgtcaga tcgtattgaa ctgcggcgaa 1380  
gaaccgtctg ttgttgctaa caccgttaaa ggccggcgacg gcaactacgg ttacaacgca 1440  
gcaaccgaag aatacggcaa catgatcgac atgggtatcc tggatccaac caaagtaact 1500



cgttctgctc tgcagtacgc agcttctgtg gctggcctga tgatcaccac cgaatgcatg 1560  
gttaccgacc tgccgaaaaa cgatgcagct gacttaggcg ctgctggcgg tatgggcggc 1620  
atgggtggca tgggcggcat gatgtaa 1647

<210> 2

<211> 1266

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atggatgtgc tcagccctgg tcagggaac aacaccacat caccaccggc tccctttgag 60  
accggcggca acactactgg tatctccgac gtgaccgtca gctaccaagt gatcacctct 120  
ctgctgctgg gcacgctcat cttctgcgcg gtgctgggca atgcgtgcgt ggtggctgcc 180  
atgccttgg agcgctccct gcagaacgtg gccaatatc ttattggctc tttggcggtc 240  
accgacctca tgggtgtcggg gtgggtgctg cccatggccg cgctgtatca ggtgctcaac 300  
aagtggacac tgggccagggt aacctgcgac ctgttcatcg cctcgcagct gctgtgctgc 360  
acctcatcca tcttgacact gtgcgccatc gcgctggaca ggtactgggc catcacggac 420  
cccacgact acgtgaacaa gaggacgccc cggccgcgtg cgctcatctc gtcacttgg 480  
cttattggct tcctcatctc tatcccgccc atcctgggct ggcgcacccc ggaagaccgc 540  
tcggaccccc acgcatgcac cattagcaag gatcatggct acactatcta ttccaccttt 600  
ggagctttct acatcccgt gctgctcatg ctggttctct atgggcgcat attccgagct 660  
gcgcgcttcc gcatccgcaa gacggtcaaa aagggtggaga agaccggagc ggacaccgc 720  
catggagcat ctcccgcccc gcagcccaag aagagtgtga atggagagtc ggggagcagg 780  
aactggaggc tgggcgtgga gagcaaggct gggggtgctc tgtgcgcaa tggcgcggtg 840  
aggcaagggt acgatggcgc cgccctggag gtgatcgagg tgcaccgagt gggcaactcc 900  
aaagagcact tgcctctgcc cagcgaggct ggtcctaccc cttgtgcccc cgcctctttc 960  
gagaggaaaa atgagcgcaa cgccgaggcg aagcgcaaga tggccctggc ccgagagagg 1020  
aagacagtga agacgtggg catcatcatg ggcaccttca tcctctgctg gctgcccttc 1080  
ttcatcgtgg ctcttgttct gcccttctgc gagagcagct gccacatgcc caccctgttg 1140

ggcgccataa tcaattggct gggctactcc aactctctgc ttaaccccg t catttacgca 1200  
tacttcaaca aggactttca aaacgcgttt aagaagatca ttaagtgtaa cttctgccgc 1260  
cagtga 1266

<210> 3

<211> 1641

<212> DNA

<213> Thermococcus sp. KS-1

<400> 3

atggcccagc ttgcaggcca gccagttggt attctacctg agggaaactca gaggtacgtt 60  
ggaagggagc cccagaggct caacattctt gctgccagga ttatagccga gacggttaga 120  
accacccttg gaccaaaggg aatggacaag atgctcgttg acagcctcgg cgacatcgtc 180  
atcaccaacg acggtgcaac cattctcgac gagatggaca tccagcacc tgctgctaag 240  
atgatgggtg aggttgctaa gactcaggat aaggaggctg gtgatggtag tactactgcg 300  
gttggtattg ctggtgagct tctgaggaag gctgaggagc ttctcgacca gaacattcac 360  
ccgagcataa tcatcaaggg ctacgccctc gcagcagaga aagcccagga aatactcgac 420  
gagatagcca aggacgttga cgtcgaggac agggagattc tcaagaaggc cgcggtcacc 480  
tccatcaccg gaaaggccgc cgaggaggag agggagtagc tcgctgagat agcagttgag 540  
gccgtcaagc aggttgccga gaaggttggc gagacctaca aggtcgacct cgacaacatc 600  
aagttcgaga agaaggaagg tggaagcgtc aaggacacc agtccataaa ggggtgctgc 660  
atcgacaagg aggtcgtcca cccaggcatg ccgaagaggg tcgagggtgc taagatcgcc 720  
ctcatcaacg aggcccttga ggtcaaggag actgagaccg acgccgagat caggatcacc 780  
agcccggagc agtccaggc cttccttgag caggaggaga agatgctcag ggagatggtc 840  
gacaagatca aggaggtcgg cgcgaacgtc gtgttcgtcc agaaggcat tgacgacatt 900  
gcccagcact acctggccaa gtacggcata atggcagtca ggagggtcaa gaagagcgac 960  
atggagaagc tcgccaaggc cactggagct aagatcgtca ccaacgtccg cgacctcacc 1020  
ccggaggacc tcggtgaggc cgagctcgtc gagcagagga aggtcgccgg cgagaacatg 1080  
atcttcgtcg agggctgcaa gaaccgaag gcagtgacaa tactcatcag gggcggtacc 1140

gagcacgtcg ttgacgaggt cgagagggcc ctcgaggatg ccgtcaaggt cgtcaaggac 1200  
atcgtcgagg acggcaagat cgtcgccgcc ggcggtgctc cggagatcga gctcagcatc 1260  
aggctcgacg agtacgcgaa ggaggtcggc ggcaaggagc agctcgccat cgaggccttt 1320  
gcagaggccc tcaaggtcat tccgaggacc ctcgccgaga acgccggtct cgacccgac 1380  
gagaccctcg ttaaggtcat cgccgcccac aaggagaagg gaccgacat cggtgttgac 1440  
gtcttcgagg gcgagccggc cgacatgctc gagcgcggcg tcatcgcccc ggtcagggtt 1500  
ccgaagcagg ccatcaagag cgccagcgag gccgccataa tgatcctcag gatcgacgac 1560  
gtcatcgccg ccagcaagct cgagaaggac aaggagggcg gcaagggcgg tagcgaggac 1620  
ttcggaagcg atctcgactg a 1641

【図面の簡単な説明】

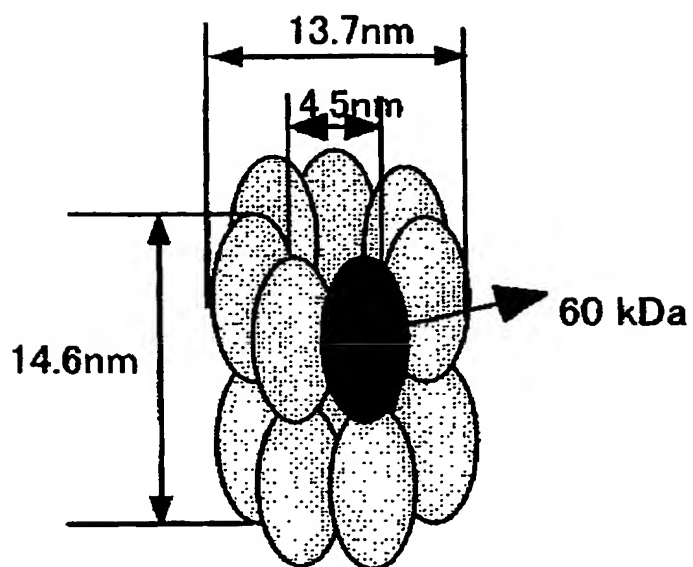
【図 1】

大腸菌シャペロニン (G r o E L) の立体構造を模式的に表す図である。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ほとんど全ての抗原蛋白について簡便に作製することができ、その抗原性を安定的に効率よく発現させることができる免疫原及びその免疫原を用いた抗体の作成方法を提供する。

【解決手段】 シャペロニンと抗原蛋白とがペプチド結合を介して連結された融合蛋白質からなる免疫原であって、前記抗原蛋白は、シャペロニンリングの内部に収納されている免疫原。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 1 4 5 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 2 1 7 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区西天満 2 丁目 4 番 4 号

氏 名

積水化学工業株式会社

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**